昆虫学报 Acta Entomologica Sinica, December 2005, 48(6):854-858 ISSN 0454-6296

家蚕丝蛋白重复片段替换人体α-突触核蛋白核心片段的研究

汪剑霞[1]，胡红雨[2]，段家龙[1*]

(1. 安徽农业大学生命科学学院,合肥 230036; 2. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

摘要：家蚕 *Bombyx mori* 丝丝心蛋白(silk fibroin)结晶域与人类帕金森综合症的致病蛋白α-突触核蛋白(α-synuclein, α-Syn)的积聚原理类似,都是由一段非常疏水的氨基酸组成的保守序列和一些无序卷曲,并在一定条件下发生整体的结构转换而发生纤维化所致。研究发现在这2种蛋白中存在的疏水片段是它们形成β折叠的关键。为了研究α-Syn蛋白的积聚核心在被别的积聚核心所替换后是否还可以正常纤维化,我们用PCR技术将家蚕丝丝心蛋白的核心片段替换α-Syn$_{1-74}$(α-Syn$_{74}$)的核心,组成一个重组蛋白α-Syn$_{74}$SFX,纯化后温育6天,用ThT荧光和原子力显微镜检测该重组蛋白的结构,结果表明α-Syn$_{74}$SFX未能发生纤维化。这说明具备能形成β片层的片段和无序卷曲这2个因素,并不能绝对使蛋白发生整体的结构转换。这对人工蚕丝的研究具有参考价值。

关键词：家蚕；丝心蛋白；α-突触核蛋白；积聚；纤维化

中图分类号：Q965 文献标识码：A 文章编号：0454-6296(2005)06-0854-05

Replacement of core region of human α-Synuclein$_{1-74}$ with the repeats of *Bombyx mori* fibrion

WANG Jian-Xia[1], HU Hong-Yu[2], DUAN Jia-Long[1*] (1. College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: The formation mechanism of the crystalline domain in *Bombyx mori* silk fibrion is just similar to that of α-synuclein (α-Syn), which is the pathogenic protein of human Parkinson's disease. That is to say, under the certain condition, a conservative sequence made of very hydrophobic amino acids and some random coils would cause the whole structure conversion and fibrillization of a protein. It had been found that the hydrophobic region of these two proteins was the key to the formation of β sheet. In order to study whether α-synuclein can be fibrillized after its aggregating core is replaced by another, we replaced the core region of α-Syn$_{1-74}$ (α-Syn$_{74}$) with the core region of *B. mori* silk fibrion using the PCR technique, and constituted a recombinant protein named as α-Syn$_{74}$SFX. After purification and incubation for 6 days, the structure of α-Syn$_{74}$SFX was examined with atomic force microscope (AFM) and ThT fluorescence. The results showed that fibrillization did not occur in α-Syn$_{74}$SFX. This suggests that the availability of a core region important to form β sheet and a random coil region does not necessarily make a protein to fibrillize. The research provided clues for the study of artificial silk.

Key words: *Bombyx mori*; fibrion; α-synuclein; aggregation; fibrillization

最近,一种称为成核依赖型的积聚过程(也称为聚合过程或结晶过程)机理被用来解释许多病毒蛋白的失活过程。这些研究包括:正常态的病毒蛋白PrPc转变为致病蛋白PrPs[1]c (Morrissey and Shakhnovich, 1999);β淀粉状Aβ蛋白转变为Aβ淀粉状纤维蛋白的过程(Harper and Lansbury, 1997)以及α-突触核蛋白(α-synuclein, α-Syn)的纤维化过程(Wood *et al*., 1999)等。又有研究表明家蚕丝蛋白由无序卷曲向β折叠构象的转变也是一个成核依赖性的β折叠聚集过程。通过序列比较发现在Aβ肽、

基金项目：国家自然科学基金项目(30371088)

作者简介：汪剑霞,女,1976年生,安徽绩溪人,硕士研究生,研究方向为昆虫生理学,E-mail: wangjianxia000@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: duanjialong00@163.com

收稿日期 Received: 2005-01-31; 接受日期 Accepted: 2005-06-02

PrP 和 α-Syn 中均有一段由非常疏水的氨基酸组成的保守序列 VGGAVVAGV（$A\beta_{36-44}$，$PrP_{117-125}$，α-Syn_{66-74}）（Morrissey and Shakhnovich，1999）。该基序由 Gly、Ala 和 Val 3 种氨基酸残基组成，它们在蛋白质的积聚过程中可能起到不同的作用。Gly 最具柔性，有助于序列在溶液中保持无序卷曲状态；Ala 可以诱导形成蛋白质二级结构；而疏水性的 Val 具有很强的形成 β 折叠的趋向。蚕丝丝心蛋白结晶区中含有大量疏水性的、保守型很强的重复序列由 Gly 和 Ala 组成。家蚕 *Bombyx mori* 丝心蛋白（silk fibroin）结晶域与人类帕金森综合症的致病蛋白 α-Syn 的积聚原理类似，都是由一段非常疏水的氨基酸组成的保守序列和一些无序卷曲在一定条件下发生整体的结构转换，发生纤维化所致。研究发现这 2 种蛋白中的疏水片段是形成 β 折叠的关键（Li *et al*.，2001；Ji *et al*.，2005）。家蚕丝丝心蛋白中的重复片段 SFX（X 表示多肽的个数）氨基酸序列如下：SF7a： VGYGAGV；SF7b： VGAGYGV；SF9：YGAGVGAGY； SF10： GAGAGSGAGA； SF11：VGAGYGAGAGV。

为了研究是否具有这样类似的积聚核心片段和没有结构的无序卷曲片段就能温育出具有 β 折叠结构的纤维，我们试用家蚕丝丝心蛋白中的重复片段 SFX 替换 α-Syn_{1-74}（α-Syn_{74}）中的“VGGAVVAGV”基序，构建重组蛋白 α-Syn_{74}SFX，研究它能否积聚，从而为蛋白质淀粉样化的分子机制提供依据。

1　材料和方法

1.1　材料

pET-3a 质粒、α-Syn_{74} 基因、克隆菌株 *E*. *coli* DH5α 及表达菌株 *E*. *coli* BL21（DE3）均为中国科学院上海生化所实验室保存。Sephadex G-25、CM Sepharose Fast Flow（CM FF）、Superose 12 凝胶介质以及预装柱和 FPLC 柱均购自 Amersham Pharmacia 公司。YM-3 型 centricon 购自 Millipore 公司。thioflavin T（ThT）购自 Aldrich 公司。0.2 μm 注射过滤器购自 Pall Corporation。盐酸胍（GdmCl）购自 USB 公司。PCR 循环仪 SingleBlock™购自 Ericomp 公司。微型垂直电泳仪及相关设备购自 Bio-Raid 公司。

1.2　酶和试剂

限制性内切酶 *Nde* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ，T4 DNA 连接酶，rTaq 酶及相关缓冲液购自 TaKaRa 公司；Pfu DNA 聚合酶、dNTPs 购自申能博彩公司；胶回收试剂盒为 Waston 公司产品。

1.3　PCR 体外扩增目的基因 DNA

表达 α-Syn_{74} 蛋白的 pET-3a 载体由中国科学院上海生化所吉丽娜博士构建。以 α-Syn_{74} 的基因为模板，利用 PCR 方法扩增目标基因的 DNA 片段，然后用 *Nde* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切，把基因片段插入到 pET-3a 质粒中，得到阳性克隆并测序。所有 PCR 反应均在 PCR 循环仪 MiniCycler™上完成。

1.4　DNA 重组

质粒抽提、酶切、PCR、琼脂糖凝胶电泳、DNA 片段的回收、感受态细胞的制备、连接和转化等操作参考 Sambrook 等（1995）方法。以含 α-Syn_{74} 基因的 pET-3a 质粒为模板，采用反向引物得到突变体 α-Syn_{74}SF7a、SF7b、SF9、SF10 和 SF11。

由于 C-端缺失突变体的摩尔消光系数很低，为方便实验中蛋白质的检测和定量，均将其第 4 位残基由 Phe（苯丙氨酸）突变为 Trp（色氨酸）。

以下突变体均以 α-Syn_{74} 基因为模板，T7 promoter 引物为正向引物。各基因的 PCR 引物序列见下：

T7 promoter 引物（5′端，20 个核苷酸）：5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′；SF7a 的反向引物（44 个核苷酸）：5′-GCGGATCCTTAAACACCAGCACCGTATCCAACATTTGTCACTTG-3′；SF7b 的反向引物（44 个核苷酸）：5′-GCGGATCCTTAAACACCGTAACCAGCTCCAACATTTGTCACTTG-3′；SF9 的反向引物（57 个核苷酸）：5′-GCGGATCCTTAGTAACCAGCACCAACACCAGCACCGTAATTTGTCACTTGCTCTTTG-3′；SF10 的反向引物（60 个核苷酸）：5′-GCGGATCCTTAAGCACCAGCACCGGAACCAGCACCAGCACCATTTGTCACTTGCTCTTTG-3′；SF11 的反向引物（56 个核苷酸）：5′-GCGGATCCTTAAACACCAGCACCAGCACCGTAACCAGCTCCAACATTTGTCACTTG-3′。

1.5　外源基因表达及产物分析法

将构建好的重组质粒 pET-3aα-Syn_{74}SFX 转化宿主菌 BL21（DE3），然后挑选单克隆，即为 α-Syn_{74}SFX 的表达菌株，并接种于含 Amp（100 μg/mL）的 LB 培养基中，摇床中 37℃培养过夜，按 2%转接，37℃培养 3 h，加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，诱导表达 3 h，SDS-PAGE 电泳检测。

1.6　重组蛋白纯化

表达质粒均转化到大肠杆菌 BL21（DE3）菌株

中。从新鲜复苏的平板上挑取单菌落接种于 50 mL LB 培养基中，37℃过夜振荡培养。次日将过夜菌按 1∶100 接种于 2 L LB 培养基中，37℃振荡培养至 A_{600} 达到 0.6～0.8 时，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG，在 200 r/min 下继续培养 3～4 h。以后操作均在冰上进行：4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体，经冰上预冷的洗菌缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0）洗涤后，按每升 LB 培养基的菌体悬浮于 40 mL 缓冲液的比例加入破菌缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl，50 mmol/L NaCl，0.5 mmol/L EDTA，0.5 mmol/L PMSF，pH 8.0）。将菌液置于冰浴中超声波破菌，然后将破菌液于 15 000 r/min 离心 20 min。测量上清液体积，以约 50%饱和度的 $(NH)_2SO_4$ 溶液沉淀，冰浴上搅拌 1 h 后，8 000 r/min 离心 25 min。将沉淀用尽可能少的平衡缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0）溶解，高速离心去除不溶物。

用 Sephadex G-25 柱脱盐，上样于预先用缓冲液（10 mmol/L MOPS，pH 7.0）平衡的 CM FF 阳离子交换层析柱，然后用含有 0～500 mmol/L NaCl 的洗脱液（10 mmol/L MOPS，pH 7.0）进行梯度洗脱，分部收集穿出蛋白组分。SDS-PAGE 鉴定蛋白质条带，并把含有目标蛋白质的组分合并，用 YM-3 型 Centricon 氮气高压浓缩（3K 滤膜）。再用缓冲液（100 mmol/L 磷酸盐，100 mmol/L NaCl，pH 7.0）预先平衡的 FPLC Superose-12 柱层析进一步纯化，可得到 95%以上纯度的蛋白质。

1.7 蛋白含量的测定

根据 Lasergene 软件预测的蛋白质的摩尔吸光系数 ε 值，用光吸收法在岛津 UV-2100 紫外可见分光光度计上确定蛋白质的准确浓度。所用缓冲液（100 mmol/L 磷酸盐，100 mmol/L NaCl，pH 7.0）调零后测量。

1.8 蛋白质积聚时间曲线测定

将待测蛋白质用 YM-3 Centricon 浓缩器浓缩蛋白质溶液，将样品浓度调整到 200 μmol/mL。所用缓冲体系为 PBS 缓冲液：100 mmol/L 磷酸盐，100 mmol/L NaCl，pH 7.0，0.05% NaN_3。蛋白质用 0.2 μm 无菌注射过滤器过滤以除去颗粒状物质。滤液分装于 1.5 mL Eppendorf 管中，每管内装 1 mL 样品溶液，用 Parafilm 膜封好管口，置于 37℃摇床内以 200 r/min 保温振荡。在不同时间点于超净台内取一定量的蛋白样品（混匀），保存于 −20℃冰箱内待检测。剩下样品溶液封口后继续保温。取 20 μL 不同保温时间的样品分别与 980 μL 5 μmol/L 的 ThT 溶液（50 mmol/L Glycine-NaOH，pH 9.0）充分混合，蛋白质荧光发射光谱的激发波长为 446 nm，激发光栅宽度 5 nm，发射光栅宽度 10 nm，扫描 460 nm～560 nm 的校正光谱，分别记录 482 nm 的荧光发射光强度值（F_{482}），拟合保温时间与 F_{482} 的曲线图。

1.9 原子力显微镜（AFM）实验

将待测样品用 PBS 缓冲液稀释至 10 μmol/L 并轻微振荡混匀。取 5 μL 稀蛋白溶液滴在新解理的云母（Alfa Aesar 公司）上，5 min 后用去离子水轻柔地冲洗云母，将没有吸附的蛋白质洗去。吹干云母表面，置于样品台上成像，以 PBS 缓冲液作为对照。所用 AFM 为美国 Digital Instruments 公司生产的 Nanoscope Ⅲ系统，扫描头扫描范围为 130 μm × 130 μm，所有的图像均是在空气中用 Tapping 模式获得。每个样品至少观察 5 个不同的区域以保证重复性。针尖为 Digital Instruments 公司生产，弹性系数 20～100 N/m。更换样品或针尖时，扫描参数略有改变。一般情况下实验参数在以下范围内变化：针尖的振荡电压为 20～40 mV，setpoint 值为 0.4～0.6 V，驱动频率为 280～340 kHz，扫描速率为 1.1～2.5 Hz。

2 结果

2.1 重组蛋白的构建

利用 pET 载体系列的通用引物 T7 promoter 和与基因序列特异性结合的引物进行 PCR 反应，然后通过基因上的 *Nde* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ酶切位点直接双酶切后，将产物插入到 pET-3a 表达载体上。测序结果显示完全正确。将 α-Syn_{74} 的 GAV 基序用 SFX 替换，构建出 α-Syn_{74} SFX。

2.2 重组蛋白的表达

由于蛋白质的分子量较小，采用 Tris-Tricine SDS-PAGE 系统进行全细胞电泳来鉴定目的蛋白的表达情况（图 1）。结果所做的 5 个重组蛋白表达量都很高。α-Syn_{74} SF7b 和 α-Syn_{74} SF7a 的表达情况一样，所以 α-Syn_{74} SF7b 的表达电泳图在此略去。

2.3 重组蛋白的纯化

在确认了目的蛋白的表达后，进一步纯化出蛋白。使用 CM FF 阳离子交换层析柱和 FPLC superose-12 柱纯化 α-Syn_{74} SFX 蛋白，15% SDS-PAGE 显示蛋白质纯度均在 95%以上（图 2）。其他 4 个蛋白纯化过程同 α-Syn_{74} SF7a。如图 2 所示，目的蛋白过 CM FF 阳离子交换层析柱后，挂柱情况很好，几乎

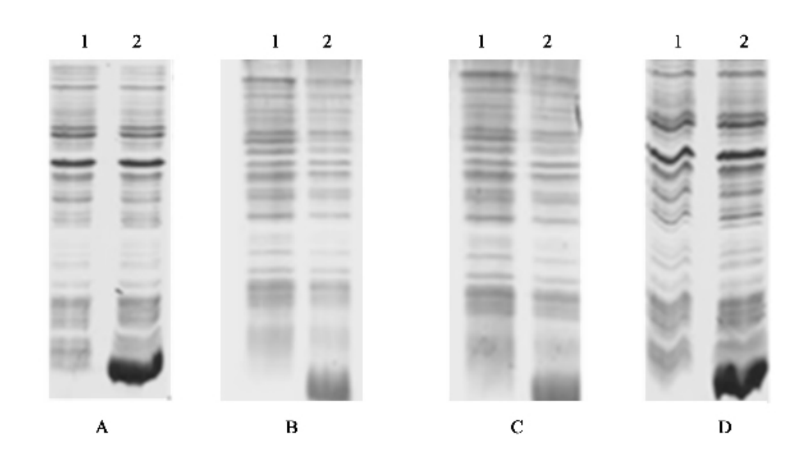


图 1　α-Syn_{74}SF7a（A）、SF9（B）、SF10（C）和 SF11（D）的蛋白表达电泳图

Fig. 1　Electrophoretogram showing the expression of α-Syn_{74}SF7a（A），SF9（B），SF10（C），and SF11（D）

1. 诱导前 Before induction；2. 诱导后 After induction.

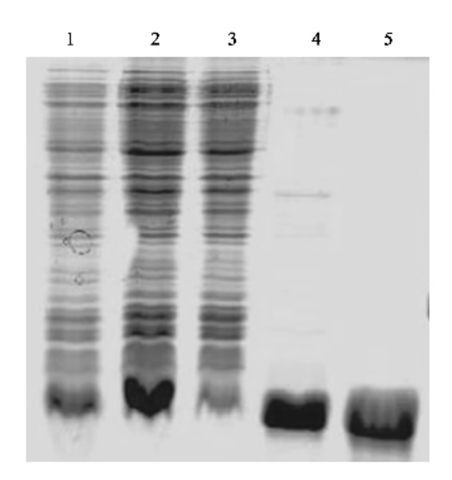


图 2　纯化 α-Syn_{74}SF7a 的 15% SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2　Electrophoretogram showing 15% SDS-PAGE of purified α-Syn_{74}SF7a

1. 全细胞 Whole cell；2. 破菌上清液 The resultant supernatant（lysate）；3. 过 CM 柱的穿出液 The liquid through the CM；4. 过 CM 柱后的目标蛋白液 The target after CM；5. 过 FPLC 后的目标蛋白 The target after FPLC.

没有穿出。用 0～0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱后，所得蛋白就比较纯了。接着用 FPLC superose-12 柱进一步纯化，目的蛋白的纯度可达到 95%以上。

2.4　用 SFX 替换^{66}VGGAVVTGV^{74}区域后的积聚影响

我们用 SFX 替换 α-Syn_{74}中的^{66}VGGAVVTGV^{74}片段，并且比较了它们之间积聚性质的差异（图 3）。荧光染料 ThT 可以特异性地与纤维化的蛋白质有效结合，表现出荧光强度增强，而且这种结合不依赖于特定的氨基酸序列（LeVine，1999）。具体表现在 446 nm 波长光的激发下，482 nm 附近会出现一个很强的峰，通过峰值的变化可以半定量地确定形成纤维的相对速率。

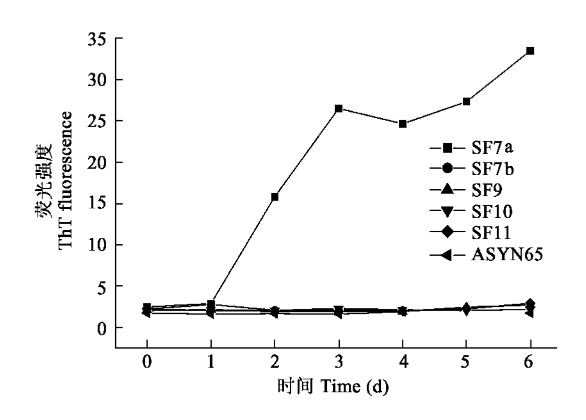


图 3　α-Syn_{74}SFX 温育 6 天后的 ThT 荧光检测

Fig. 3　ThT fluorescence assay of α-Syn_{74}SFX incubated for 6 days

从 ThT 荧光分析实验中可以看出，只有重组蛋白 α-Syn_{74}SF7a 在 6 天的保温时间内形成了少量积聚物，ThT 的荧光强度值略有增加（图 3）。由于 α-Syn_{74}SF9、α-Syn_{74}SF10、α-Syn_{74}SF11 和 α-Syn_{74}SF7b 的 ThT 荧光检测结果一样，我们只对 α-Syn_{74}SF7a 和 α-Syn_{74}SF7b 进行了 AFM 观测。通过 AFM 观测发现，α-Syn_{74}SF7a 和 α-Syn_{74}SF7b 样品并没有形成有序的纤维，样品形成的积聚物既不是颗粒状的寡聚体，也不是典型的纤维，而是不定形的蛋白质沉淀物，即无规则的积聚物（图 4）。

3　讨论

常规的基因构建方法中，一般都先将 PCR 产物连接到 T 载体上进行蓝白斑筛选，以确定突变基因

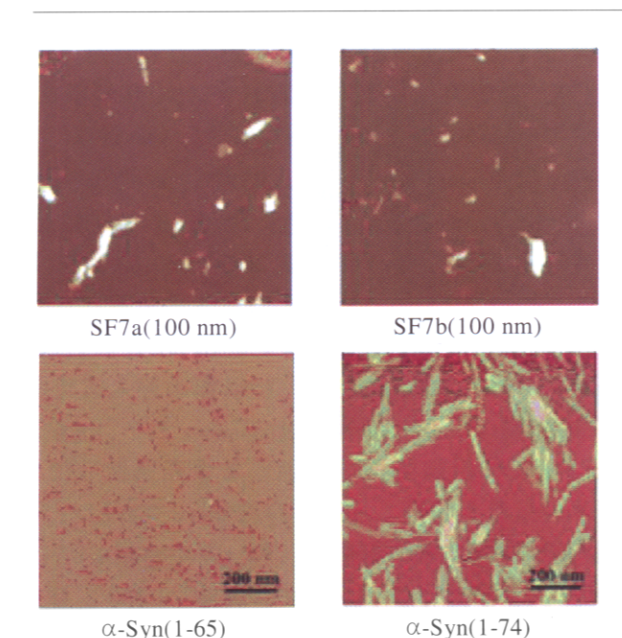


图 4 α-Syn_{74} SF7a、α-Syn_{74} SF7b、α-Syn_{65} 和 α-Syn_{74} 的 AFM 观测结果

Fig. 4 AFM images of α-Syn_{74} SF7a, α-Syn_{74} SF7b, α-Syn_{65}, and α-Syn_{74}

样品保温 6 天 The samples were incubated for 6 days.

是否正确插入到载体上。本实验中 PCR 产物长度普遍较小,所以利用了 pET 载体系列的通用引物 T7 promoter 和与基因序列特异性结合的引物进行 PCR 反应,然后通过基因上的 *Nde* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切位点直接双酶切后,将产物插入到 pET-3a 表达载体上。这样既增加了 PCR 产物的长度,便于观测回收;又避免了 T 载体的连接鉴定,便于 *Nde* Ⅰ 位点的直接酶切。所选方案既节省了时间,准确率也不会下降,测序结果显示完全正确。LeVine(1999)研究发现荧光染料 ThT 可以特异性地与纤维化的蛋白质有效结合,表现出荧光强度增强,而且这种结合不依赖于特定的氨基酸序列。我们先预测蛋白的结构变化,最后用原子力显微镜直观地检测蛋白的性状。

在体外实验中已经证明 α-Syn 蛋白很容易积聚成纤维物,并且其中的 ^{66}VGGAVVTGV^{74} 序列对其积聚起决定性作用(Serpell *et al*.,2000; Conway *et al*.,2002; Du *et al*.,2003)。为了进一步确证这一观点,Ji 等(2005)通过基因重组的方法单独表达了 α-Syn_{65}(α-Syn 蛋白 N 端第 1~65 个氨基酸)和 α-Syn_{74}(α-Syn 蛋白 N 端第 1~74 个氨基酸)蛋白片段。说明了蛋白质中的局部区域对其整体的积聚行为有调节作用。GAV 基序需要存在于具有无序卷曲的结构的宿主蛋白中才能引发其整体的结构转换,并发生纤维化。而家蚕丝蛋白结晶区域的几个重复性很大的片段(SFX)已经证明是蚕丝蛋白形成 β 折叠的核心片段。家蚕丝心蛋白由无序卷曲向 β 折叠的转变及积聚过程中,蚕吐丝过程存在着成核依赖型的机理(Li *et al*.,2001)。Li 等(2001)及 Ji 等(2005)研究发现"VGYGAGV"、"GAGAGS"等这些非常疏水的片段在丝心蛋白中大量重复,是构成 β 片层的重要成分。为了研究是否具有这样类似的积聚核心片段和没有结构的无序卷曲片段就能温育出具有 β 折叠结构的纤维,我们将蚕丝蛋白和 α-Syn_{74} 蛋白的积聚核心片段做了替换,结果发现没有长成明显的纤维。这说明有能形成 β 片层的片段和无序卷曲 2 个因素还是不能使蛋白发生整体的结构转换,这为人工蚕丝的研究提供了依据,也为蛋白质淀粉样化的分子机制提供了依据。

致谢 中国科学院上海生化细胞研究所 S102 组的全体工作人员在实验中提供了帮助。

参 考 文 献 (References)

Conway KA, Harper JD, Lansbury PTJr, 2000. Fibrils formed *in vitro* from *alpha*-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 39(10): 2 552-2 563.

Du HN, Tang L, Luo XY, Li HT, Hu J, Zhou JW, Hu HY, 2003. A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human *alpha*-synuclein. *Biochemistry*, 42(29): 8 870-8 878.

Harper JD, Lansbury PTJr, 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 66: 385-407.

Ji LN, Du HN, Zhang F, Li HT, Luo XY, Hu J, Hu HY, 2005. An unstructured region is required by GAV homologue for the fibrillization of host proteins. *The Protein Journal*, 24(4): 209-218.

LeVine H, 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.*, 309: 274-284.

Li GY, Zhou P, Shao ZZ, Xie X, Chen X, Wang HH, Chunyu LJ, Yu TY, 2001. The natural silk spinning process: A nucleation-dependent aggregation mechanism? *Eur. J. Biochem.*, 268: 6 600-6 606.

Morrissey MP, Shakhnovich EI, 1999. Evidence for the role of PrPC helix 1 in the hydrophilic seeding of prion aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 11 293-11 298.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1995. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA, 2000. Fiber diffraction of synthetic α-synuclein filaments shows amyloid-like cross-β conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4 897-4 902.

Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citrom M, Biere AL, 1999. *alpha*-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. *J. Biol. Chem.*, 274: 19 509-19 512.

(责任编辑: 黄玲巧)